



TITLE:

Structural studies on cyano group  
biosynthesis by [NiFe] hydrogenase  
maturation proteins( Digest\_要約 )

AUTHOR(S):

Tominaga, Taiga

---

CITATION:

Tominaga, Taiga. Structural studies on cyano group biosynthesis by [NiFe] hydrogenase maturation proteins. 京都大学, 2013, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2013-11-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k17942>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開

# 学位論文の要約

Structural studies on cyano group biosynthesis by [NiFe] hydrogenase maturation proteins  
([NiFe]ヒドロゲナーゼ成熟化タンパク質によるシアノ基生合成過程の構造学的研究)

富永 大河

## 序論

ヒドロゲナーゼは、水素の酸化還元反応を触媒する酵素であり、多くの細菌において、プロトン濃度の調節や、エネルギー代謝を円滑に進める役割を担っている。Ni と Fe を含む [NiFe]ヒドロゲナーゼにおいては、Ni 原子と Fe 原子が活性部位のシステイン残基に結合しており、Fe 原子には 2 つのシアノ基と一酸化炭素が配位し、NiFe クラスターを形成している。NiFe クラスターの生合成および配位子の導入には、6 種類の Hyp タンパク質 (HypA-HypF) が関与している。各 Hyp タンパク質により段階的に Ni や Fe が組み込まれ、成熟化が完了する。最初に、HypF がカルバモイルリン酸のカルバモイル基を HypE の C 末にあるシステイン残基に転移させる。転移されたカルバモイル基は、HypE の ATP 依存的な脱水反応によってシアノ基に変換される。その後、HypC と HypD により Fe 原子の組み込み、HypA と HypB により Ni 原子の組み込みが行われる。

これまでに HypF を除く 5 種類の Hyp タンパク質の立体構造が当研究室などによって決定され、[NiFe]ヒドロゲナーゼの成熟化機構に関する知見が多く得られてきた。しかしながら、HypF は N 末に存在するアシルホスファターゼ (ACP) ドメインを除き構造が未知であった。また、HypE に関しては、立体構造はすでに決定されたものの、カルバモイル基を認識し、脱水する機構については構造学的な根拠に基づいて議論されていない。本研究では、HypE と HypF が担当するシアノ基の合成過程に着目し、反応機構を分子レベルで解明するため、HypF ならびに HypE のカルバモイル化およびシアノ化状態の結晶構造解析を行った。

## HypF の結晶構造解析

超好熱性古細菌 *Thermococcus kodakarensis* KOD1 由来の HypF (TkHypF) の発現、精製、結晶化、X 線回折実験を行った。本研究の期間中、*Escherichia coli* 由来 HypF (EcHypF) の ACP ドメイン欠損体、*Caldanaerobacter subterraneus* 由来 HypF (CsHypF) の構造が報告されたので、これらの構造をモデルとした分子置換法と、単波長異常分散法を組み合わせた方法で位相を決定し、4.5 Å 分解能で構造を決定した。

HypF の ACP、Zn フィンガー、ミドル、C 末の各ドメインの電子密度は全てはっきり確

認できた。TkHypF, EcHypF, CsHypF の間で C 末ドメインに対する相対位置は少しずつ異なっていた。また, TkHypF の非対称単位中の分子同士で ACP ドメインの相対位置が異なっており, ACP ドメインと Zn フィンガードドメイン間もディスオーダーしていた。このことから HypF の ACP ドメインは, 比較的揺らぎが大きいことが示唆される。ACP ドメインと Zn フィンガードドメインの間には, 保存性が高く, 強く正に帯電しているポケットが存在していた。CsHypF の構造ではこのポケットにリン酸イオンが結合していることと, ACP ファミリーでもこの領域の残基が保存されていることなどから, このポケットにおいてカルバモイルリン酸が加水分解され, カルバメート中間体が生成していると考えられる。また, ポケットの大きさが基質の選択性に影響すると考えられるので, ACP ドメインの揺らぎが HypF の基質認識を制御している可能性が示唆される。

#### HypE のカルバモイル化およびシアノ化状態の結晶構造解析

大腸菌発現系で発現し, 精製した *T. kodakarensis* 由来の HypE (TkHypE) にシアン酸カリウムを加えて C 末のシステイン残基をカルバモイル化した。AMPPNP および ATP との共結晶化を行い, それぞれ 1.53 Å, 1.64 Å 分解能の結晶構造を決定した。AMPPNP 結合型の結晶構造では C 末のシステイン残基は部分的にカルバモイル化されており, 50%がカルバモイル化, 50%が未反応というモデルが最も電子密度に適合した。ATP 結合型のデータにおいても, 同様に 50%のシステインがシアノ化されていた。ATP/AMPPNP 結合部位においては, ATP のリン酸基は 4 つのマグネシウムイオンに取り囲まれ, マグネシウムイオンは 5 つのアスパラギン酸残基によって支えられていた。

ATP 結合型のデータにおいては, ATP の  $\beta$  リン酸の占有率が低くなっており, 結晶化の際の pH が酸性でなかったデータでは  $\beta$  リン酸も完全に加水分解されていた。HypE を含む PurM ファミリーの中では, human selenophosphate synthetase 1 (hSPS1) という酵素が実際に ATP を AMP に加水分解することが知られている。hSPS1 と今回の ATP 結合型 TkHypE を重ね合わせると, ADP 加水分解において求核的な役割を果たすと考えられている水分子の周囲の構造が非常によく一致した。HypE も ADP を加水分解できる可能性が考えられる。

これまでの研究においてはモチーフ IV の保存されたグルタミン酸 (Glu272) が最初にカルバモイル基からプロトンを引き抜くと推定されていた。しかし, 今回の TkHypE の構造では, Glu272 はカルバモイル基の窒素原子の近くにあるものの, 直線的な攻撃をするには角度の面から不利であった。一方で, カルバモイル基の酸素原子の近くには水分子が存在し, 酸素原子およびモチーフ II の Lys134 と水素結合を形成していた。以上のことから, Lys134 が水分子を介してプロトンを引き抜き, その後 Glu272 がイミノリン酸中間体からプロトンを引き抜くことで, カルバモイル基の脱水が行われるという反応機構を提案した。